

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

BAKTERIJSKI TOKSINI I NJHOVA PRIMJENA
BACTERIAL TOXINS AND THEIR APPLICATION

SEMINARSKI RAD

Viktorija Sukser
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: prof.dr.sc. Mladen Krajačić

Zagreb, 2011.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA

1. UVOD	1
2. O PATOGENIMA I PATOGENOSTI	2
3. BAKTERIJSKI TOKSINI.....	4
3.1. Egzotoksini	4
3.1.1. A-B toksini	5
3.1.2. Toksini koji oštećuju membrane	10
3.1.3. Superantigeni	11
3.1.4. Drugi toksični proteini.....	12
3.2. Endotoksin	12
4. PRIMJENE BAKTERIJSKIH TOKSINA	14
5. ZAKLJUČAK	24
6. LITERATURA	25
7. SAŽETAK	27
8. SUMMARY	27

POPIS KRATICA

ADP: adenzin-difosfat

cAMP: ciklički adenzin-monofosfat

GTP: gvanozin-trifosfat

MAPKK: mitogen-activated protein kinase kinase (kinaza proteinske kinaze aktivirana mitogenom)

MHC: major histocompatibility complex (glavni sustav tkivne snošljivosti)

NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid

O157:H7 serotip: O se odnosi na antigen u vanjskoj membrani Gram-negativne bakterije (dio molekule lipopolisaharida), a H se odnosi na antigen flagele (biča) bakterije

SNARE: soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) attachment protein receptor (topivi proteinski receptor za fuzijski protein osjetljiv na N-etilmaleimid)

1. UVOD

Mnogo prije nego što su mikroorganizme mogli ugledati, neki su istraživači predvidjeli njihovo postojanje i ulogu kao uzročnika bolesti, i to još u 1.st.pr.Kr. u Rimu (Prescott i sur. 2005). Međutim, mikrobiologija je kao znanost «rođena» 1674. godine, kada je Antonij van Leeuwenhoek (Slika 1.), znatiželjni nizozemski trgovac tkaninama, pogledao kapljicu jezerske vode kroz staklenu leću koju je sam konstruirao. Ono što je vidio kroz takvo jednostavno povećalo bio je nedvojbeno jedan od najnevjerojatnijih prizora s kojim se čovječanstvo dotad susrelo: prvi pogled u svijet mikroba (Nester i sur. 2004).



Slika 1. Antonij van Leeuwenhoek (1632-1723)
(<http://oldschoolscience.com/2010/10/25/happy-birthday-antonie-van-leeuwenhoek/>)

Mikroorganizmi su imali, i još uvijek imaju, golem utjecaj na život svih bića. S jedne strane su kao infektivni agensi uzrokovali mnogo više smrti nego bilo koji rat, dok s druge strane život na Zemlji kakvog danas znamo ne bi mogao postojati bez njih. Mikroorganizmi čine najveći dio Zemljine biomase, a da ne spominjemo i da cijeli ekosustavi ovise o njihovim aktivnostima, koje utječu i na ljudsko društvo na bezbroj načina (Nester i sur. 2004, Prescott i sur. 2005).

Ljudi primjenjuju mikroorganizme u mnogim područjima. U prehrambenoj se industriji prirodne aktivnosti mikroorganizama koriste za proizvodnju hrane u pekarskoj, pivskoj i mliječnoj industriji. Mogu se koristiti za bioremedijaciju, tj. razgradnju raznih onečišćivača, opasnih kemikalija, ulja i nafte koji se ispuštaju u okoliš. Također su iznimno važni za sintezu korisnih proizvoda, jer se u bakterijama željeni spojevi (npr. etanol za gorivo, insekticidi, antibiotici, aminokiseline, itd.) mogu proizvoditi mnogo brže i jeftinije

nego u tvornicama. Genetičkim inženjerstvom se mikroorganizmi mogu ciljano promijeniti tako da proizvode medicinski važne tvari, kao što su inzulin, ljudski hormon rasta, cjepiva i dr., ili tako da važnim poljoprivrednim kulturama prenesu otpornosti na kukce i bolesti, ili se pak mogu koristiti za genske terapije ljudi. Mikroorganizmi služe i kao prekrasni modelni organizmi za proučavanje, jer kod njih vladaju ista osnovna metabolička i genetička svojstva kao i kod viših oblika života. Prednost je ta što se, zbog njihovog kratkog generacijskog vremena i jednostavnog uzgoja u mediju, rezultati pokusa mogu dobiti relativno brzo. Zato su veliki napretci u razumijevanju života u posljednjih stotinu godina postignuti upravo kroz istraživanja na mikroorganizmima (Nester i sur. 2004). Brojne Nobelove nagrade dodijeljene za postignuća u fiziologiji i medicini svakako su jedan od pokazatelja važnosti mikrobiologije, jer ih je oko trećina dodijeljena znanstvenicima koji su se bavili mikrobiologijom (Prescott i sur. 2005).

Mikrobiologija će i u budućnosti imati važnu ulogu u ljudskom društvu, prvenstveno zbog neprestane pojave novih infektivnih bolesti te širenja starih. Na to će mikrobiolozi morati moći odgovoriti razvojem novih lijekova i cjepiva kako bi spriječili njihovo širenje. Usto će se i dalje istraživati složeni odnos i interakcije (simbiotske i parazitske) mikroorganizama kako sa živim, tako i s neživim svijetom, ali i mikroorganizama međusobno. Veliku pažnju iziskuju i načini na koje patogeni uzrokuju bolesti, te povezanost nekih kroničnih bolesti (kao što su autoimune i kardiovaskularne bolesti) s infektivnim agensima. Mikrobiolozi će se, napokon, morati suočiti s izazovom da pažljivo procijene na koji način će ta nova otkrića utjecati na daljnji tehnološki razvoj (Prescott i sur. 2005).

2. O PATOGENIMA I PATOGENOSTI

Bakterije naseljavaju sve površine ljudskog tijela, kako vanjske (kožu), tako i unutarne (npr. unutrašnjost crijeva). Većina ih ima zaštitnu ulogu, te njihova konstantna prisutnost sprječava patogene vrste u kolonizaciji organizma i proboju domaćinovog obrambenog sustava. Dakle, tek nekolicina bakterija je zapravo patogena (uzrokuje bolesti) (Nester i sur. 2004). No uloga bakterija u bolestima nije bila odmah očita i bile su potrebne godine prije nego su znanstvenici uspostavili povezanost između mikroorganizama i bolesti. Prvi je to učinio talijanski bakteriolog Agostino Bassi, a zatim francuski znanstvenik Louis Pasteur i, nešto kasnije, njemački liječnik Robert Koch. To je dovelo i

do razvoja novih metoda istraživanja, kao i novih grana znanosti (Prescott i sur. 2005), primjerice imunologije (koja, između ostaloga, proučava i način obrane organizama od raznih patogena).

Životni ciklus patogenog mikroorganizma uključuje nekoliko koraka:

- preživljavanje izvan domaćina prije i nakon infekcije;
- transport do domaćina (najjednostavniji prijenos je putem direktnog kontakta s drugim zaraženim domaćinom, ali se može i indirektno prenijeti zrakom, tlom, vodom ili hranom);
- prihvaćanje (bakterijski patogeni, ali i mnogi nepatogeni, adheriraju se specifično za određena tkiva) i kolonizacija (patogeni često prodiru kroz sluznice i epitel pomoću litičkih enzima, te mogu prodrijeti dublje u tkiva i rasprostraniti se po cijelom tijelu, a dolaskom u krvotok imaju pristup svim organima i organskim sustavima domaćina);
- izbjegavanje obrambenih mehanizama domaćina;
- razmnožavanje i rast ili dovršavanje životnog ciklusa na ili u domaćinu ili pak u njegovim stanicama (patogen mora pronaći odgovarajući okoliš unutar domaćina, kojeg određuju dostupnost nutrijenata, te povoljni pH, temperatura i redoks-potencijal; neke bakterije invadiraju specifične stanice i postaju unutarstanični paraziti, kao što su to primjerice sve vrste roda *Rickettsia*, *Mycobacterium leprae* i drugi);
- napuštanje domaćina i ulazak u novog ili ponovno preživljavanje izvan domaćina (Prescott i sur. 2005).

Glavnu ulogu u sposobnosti patogenih bakterija da prouzroči štetu domaćinu imaju upravo njihovi toksini. Otkad su 1888. godine Émile Roux i Alexandre Yersin izolirali toksin difterije, bakterijski su toksini prepoznati kao primarni čimbenici virulentnosti raznih patogenih bakterija. Definirali su ih kao topljive tvari koje mijenjaju normalni metabolizam stanica domaćina, sa štetnim ishodom po domaćina (Schmitt i sur. 1999). Neke patogene bakterije prilagodile su se načinu slobodnog života i na život u unutrašnjosti ljudskog domaćina. U tom procesu razvili su se složeni signalni putevi koji reguliraju gene potrebne za virulentnost. Ti se geni ne nalaze samo na bakterijskom kromosomu, nego je čak većina njih smještena na plazmidu ili bakteriofagu. Obično se ti veliki dijelovi DNA koji nose gene odgovorne za virulentnost nazivaju «otoci patogenosti». Pokretni genetički elementi mogu prenositi čimbenike virulentnosti između jedinki iste vrste ili pak između različitih vrsta tzv. horizontalnim prijenosom gena. Zbog toga se može dogoditi da dvije udaljene bakterijske vrste proizvode gotovo identičan toksin

(Prescott i sur. 2005). Geni koje nose bakteriofagi mogu postati kromosomski ako fag uđe u lizogeni ciklus (tada se ugrađuje rekombinacijom u bakterijski kromosom), umjesto u litički (kada se umnožava i lizira stanicu domaćina). Prilikom prelaska iz lizogenog u litički ciklus, genom bakteriofaga može pri izrezivanju iz kromosoma sa sobom ponijeti i bakterijske gene u neposrednoj blizini. Tako se geni mogu prenijeti u drugu bakteriju koju fag sljedeću zarazi. Taj se proces naziva transdukcijom i jedan je od važnih čimbenika u evoluciji bakterija.

3. BAKTERIJSKI TOKSINI

U borbi za preživljavanjem, patogen uzrokuje oštećenje organizma domaćina (iako mu to nije cilj), što dovodi do nastanka bolesti. U većini slučajeva to oštećenje doprinosi rasprostranjenju organizma, omogućujući infekciju drugih domaćina. Šteta uzrokovana infekcijom obično je direktna posljedica patogena, odnosno toksina koje proizvodi, no može biti i indirektna posljedica imunosnog odgovora. Naime, sam upalni proces, koji se razvija kao odgovor na ulaz patogena, može oštetiti tkivo domaćina jer aktivirani fagociti na mjestu infekcije otpuštaju vlastite enzime i toksične proizvode. Osim toga, i protutijela stvorena tijekom imunosnog odgovora mogu izazvati oštećenja. Mogu formirati komplekse s antigenom te se taložiti na stijenkama žila, u bubrezima i zglobovima, ili pak mogu reagirati na domaćinovo vlastito tkivo i izazvati autoimuni odgovor (Nester i sur. 2004).

3.1. Egzotoksini

Mnogi bakterijski patogeni proizvode egzotoksine – proteine s veoma specifičnim štetnim učincima. Svrstavaju se u najjače poznate toksine i bakterije ih same izlučuju u okolinu (i to najčešće jer su i njima samima štetni ukoliko ostanu u stanici). U većini slučajeva, patogen kolonizira površinu tijela ili tkivo, pa proizvodi dovoljno toksina koji uzrokuje oštećenje. Ili se pak patogen razmnožava u hrani s kojom se proizvedeni toksin onda konzumira.

Egzotoksini mogu djelovati lokalno ili se mogu preko krvotoka raširiti po cijelom tijelu i uzrokovati sistemske učinke. Zbog svog proteinskog karaktera mogu se inaktivirati povišenom temperaturom (60 do 80°C) ili nekim kemijskim agensom, kao npr. formaldehidom. Proteini se denaturiraju, što znači da se narušava tercijarna i sekundarna

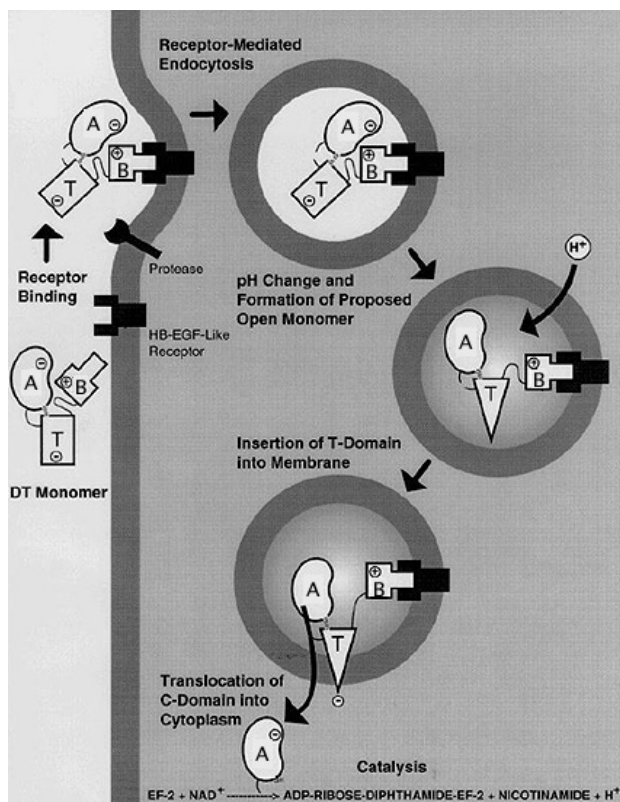
struktura, važna za njihovu funkcionalnost (dok primarna struktura ostaje ista), te pojedini dijelovi strukture nisu više u međusobnoj interakciji. Zbog toga protein postaje nefunkcionalan, ali ipak zadržava imunogeničnost. Imunosni sustav može protiv takvih, denaturiranih, proteina proizvesti protutijela, ali ne na cijeli toksin, već na njegove pojedine dijelove (jer se cijeli toksin sastoji od mnogo antigenskih determinanti). Mnogi su egzotoksini tako snažni da nepopravljiva šteta ipak nastane puno prije nego se pokrene odgovarajući imunosni odgovor. Iz tog razloga je cijepljenje pomoću toksoida (imunogenični pripravci dobiveni inaktivacijom toksina pomoću, već spomenutog, formaldehida, joda i drugih kemijskih tvari) važno u sprječavanju inače čestih bolesti kao što su tetanus i difterija, a pasivna imunost na dani toksin se može steći primjenom antitoksina, tj. protutijela proizvedenih u drugom domaćinu protiv određenog toksina (Nester i sur. 2004).

Većina egzotoksina može se razvrstati u nekoliko funkcionalnih skupina na temelju tkiva na koje specifično i negativno utječu. To su neurotoksini, enterotoksini te citotoksini. Neki egzotoksini ne mogu se svrstati niti u jednu od ovih skupina, već uzrokuju simptome povezane s pretjeranom stimulacijom imunosnog odgovora. (Nester i sur. 2004)

Uglavnom se egzotoksini dijele prema svojoj građi i mehanizmu djelovanja na: A-B toksine, toksine koji oštećuju membrane i superantigene. (Nester i sur. 2004)

3.1.1. A-B toksini

Ime im potječe od njihove građe: sastoje se od dvije zasebne podjedinice ili dijela, od kojih jedan ima enzimatsku aktivnost (A) i odgovoran je za toksičnost, dok se drugi (B) veže za specifične receptore na stanicama domaćina i tako određuje tip stanice u koju će toksin biti dostavljen (Nester i sur. 2004). Primjer djelovanja jednog od A-B toksina može se vidjeti na Slici 2.

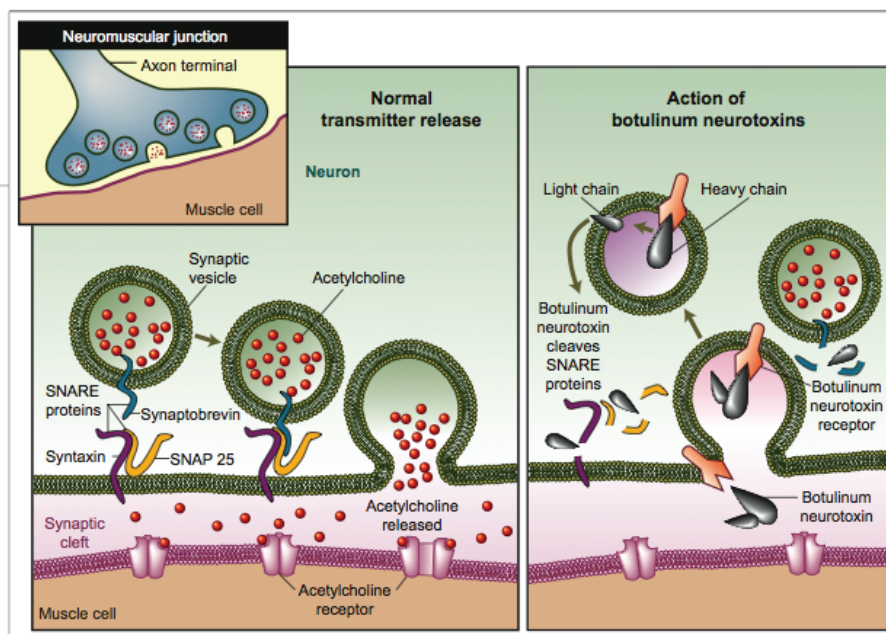


Slika 2. Primjer ulaska jednog od A-B toksina u stanicu i njegovog djelovanja (<http://www.textbookofbacteriology.net/proteintoxins.html>)

Neurotoksini oštećuju živčani sustav, uzrokujući simptome kao što su neobuzdano grčenje mišića i paraliza. Primjer je toksin tetanusa (ili tetanospazmin), kojeg proizvodi bakterija *Clostridium tetani*. Tetanospazmin se sastoji od dva peptidna lanca, od kojih se teži specifično veže za receptore na motoričkim neuronima i omogućava endocitozu lakšeg lanca. Pritom djeluje kao peptidaza: uklanja iz membrana vezikula ligand odgovoran za njihovo prihvaćanje za staničnu membranu. Time sprječava egzocitozu neurotransmitera (glicina i γ -aminomaslačne kiseline), te blokira djelovanje inhibitornih neurona, zbog čega se mišići kontinuirano i nekontrolirano kontrahiraju (Nester i sur. 2004).

Još jedan primjer neurotoksina je botulin, toksin kojeg proizvodi bakterija *Clostridium botulinum*. Različiti sojevi ove bakterije sintetiziraju jedan od sedam antigenski različitih toksina: A, B, C1, D, E, F i G, od kojih su A, B, E i F odgovorni za većinu slučajeva botulizma kod ljudi (Nester i sur. 2004). Najčešći izvor botulina je konzervirana hrana u kojoj se nalaze endospore *C. botulinum* (dehidrirani oblik stanice u kojem nema metabolizma, te može opstati u ekstremnim, nepovoljnim uvjetima). Uslijed nedovoljne termičke obrade, endospore prokljuju i razvijaju se u vegetativne stanice koje proizvede toksin tijekom svog rasta i izlučuju ga u hranu. Toksin se sastoji od dva dijela: jedan se veže na specifični receptor na završetku motoričkog živca, dok drugi (enzimski) dio ulazi u neuron i postaje aktivna peptidaza. Ona cijepa sinaptobrevin (protein u

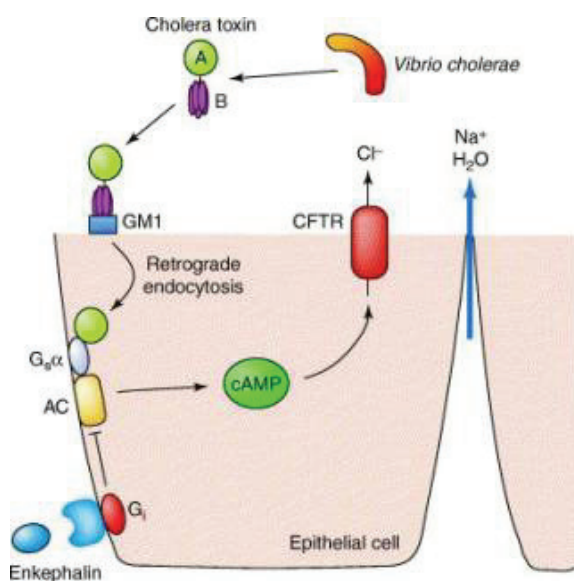
membranama sinaptičkih vezikula), čime sprječava egzocitozu neurotransmitera acetilkolina (Slika 3.). Zbog toga se mišići ne kontrahiraju i nastupa paraliza (Prescott i sur. 2005). Botulin je otporan na razgradnju želučanim enzimima i kiselinom, apsorbira se u tankom crijevu, te može u krvotoku cirkulirati čak tri i više tjedana. Jedan je od najjačih poznatih toksina, pa i najmanja količina može biti smrtonosna (Nester i sur. 2004).



Slika 3. Djelovanje toksina botulina bakterije *Clostridium botulinum* (<http://toxipedia.org/display/toxipedia/Botulinum+Toxin>)

Enterotoksini uzrokuju poremećaje u probavnom sustavu, kao što su proljev i povraćanje. Primjer toga je toksin kolere što ga sintetizira bakterija *Vibrio cholerae*. Jedan dio ovog toksina ireverzibilno se veže na specifične receptore na mikrovilima epitelnih stanica tankog crijeva. Drugi pak dio djeluje kao enzim i prenosi ADP-ribozu s NAD (česte molekule u oksido-redukcijskim reakcijama u stanicama) na G-protein. Time ovaj regulatorni protein postaje konstantno aktivan, pa se maksimalno proizvodi i nakuplja cAMP u stanicama crijeva. Posljedica toga je neprestano izlučivanje kloridnih iona i drugih elektrolita i vode iz krvi u crijevo (Slika 4.), koje ne može apsorbirati tu ogromnu količinu tekućine, što rezultira proljevom (Nester i sur. 2004). Nastanak patogene bakterije *V. cholerae* iz nepatogenog početnog soja pravi je primjer lizogene konverzije, jer bakterija postaje patogena tek kada određeni bakteriofag uđe u lizogeni ciklus te ugradi svoj genom u njen kromosom. Tako se u bakteriji mogu eksprimirati dodatni geni virusa, kao što su geni za toksine, koji nisu povezani ni s litičkim, ni s lizogenim ciklusom. U ovom slučaju, filamentozni bakteriofag CTXφ inficira nepatogenu *V. cholerae* preko posebnog pilusa, kojim se bakterija ujedno služi za prihvaćanje na stanice crijeva. Taj je pilus kodiran u

genomu drugog bakteriofaga (VPI ϕ) koji već postoji ugrađen u kromosom bakterije, te je moguće da je on i preduvjet da se bakterija može zaraziti fagom CTX ϕ . Genom faga CTX ϕ ugrađuje se upravo na specifično mjesto na kromosomu, gdje se nalazi i VPI ϕ (tzv. «otok patogenosti»). Obje podjedinice toksina kolere kodirane su genima faga CTX ϕ (Dale i Park 2004). Geni za toksin i za protein pilin (od kojeg je građen pilus) sintetiziraju se istovremeno, budući da ih regulira isti bakterijski gen pod utjecajem čimbenika iz okoliša bakterije (Nester i sur. 2004).



Slika 4. Djelovanje toksina kolere bakterije *Vibrio cholerae* (http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2005_9/Page2.htm)

Toksini nekih sojeva *Escherichia coli* također su enterotoksini. Ova bakterija je gotovo univerzalni stanovnik crijeva ljudi i životinja, te je veoma važna za njihovo zdravlje kao član crijevne mikroflore. Zbog toga su ju dugo vremena zanemarivali kao mogući uzrok bolesti probavnog sustava. Ipak, nepoželjna je na nekim mjestima u tijelu, kao što su mokraćovod, prostata i vaginalna sluznica, a nipošto nisu poželjne one *E. coli* koje sadrže dodatne gene za toksine. Enterotoksinogenične *E. coli* adheriraju se na crijevni epitel, gdje se umnažaju i rasprostranjuju (Nester i sur. 2004). Izlučuju jedan ili oba enterotoksina: temperaturno stabilan toksin ST i temperaturno labilan toksin LT (Prescott i sur. 2005), od kojih je potonji gotovo identičan toksinu kolere po djelovanju (infekcija razultira proljevom) i antigeničnosti. Oba važna čimbenika virulentnosti (enterotoksin i adhezini kojima se bakterije prihvaćaju za stanice crijeva) kodiraju geni na plazmidima, koje ove bakterije konjugacijom mogu prenijeti drugim bakterijama (Nester i sur. 2004).

Citotoksini oštećuju razne tipove stanica tako što ih liziraju ili ometaju osnovne stanične procese. Jedan od predstavnika je toksin difterije, kojeg proizvodi bakterija *Corynebacterium diphtheriae*. Proizvodnja jakog egzotoksina u ovim bakterijama ovisi o lizogenoj konverziji temperiranim bakteriofagom β (Prescott i sur. 2005), koji nosi gen za taj toksin. No ovisi i o uvjetima rasta: represor gena za toksin je aktivan kada je vezan za željezo, tako da u uvjetima s oskudnim količinama željeza represor nije aktivan, te se geni za toksin eksprimiraju. Bakterija nije invazivna, već raste i izlučuje toksin u grlu, gdje uništava lokalne stanice i stvara pseudomembranu od mrtvih domaćinovitih stanica, gnoja i krvi. Ona se može otkinuti i ometati dišne puteve, a ulaskom u krvotok može izazvati oštećenja srca, bubrega te živčanog tkiva. Toksin difterije izlučuje se u neaktivom obliku, koji se izvan stanice cijepa u dva dijela spojena disulfidnom vezom. B-lanac se veže za specifične receptore na membrani određenih stanica domaćina i cijela molekula ulazi endocitozom. Potom se unutar stanice A-lanac odvaja, aktivira se i kao enzim katalizira kemijsku reakciju ADP-ribozilacije (kao kod toksina kolere) kojom inaktivira elongacijski faktor 2 (EF-2). Budući da je EF-2 potreban za pomicanje ribosoma duž molekule mRNA, time se zaustavlja sinteza proteina i stanica domaćina umire (Nester i sur. 2004).

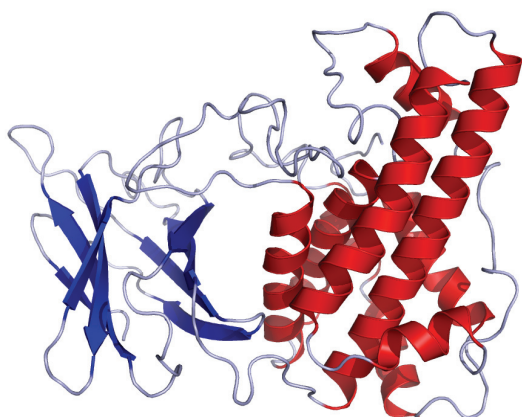
Shiga-toksin, kojeg proizvode *Shigella dysenteriae* i neki sojevi *Escherichia coli*, još je jedan primjer citotoksina. Virulentni sojevi *Shigella* posjeduju veliki plazmid ključan za prihvaćanje i ulazak bakterije u domaćinove stanice. Bakterije se prvo pomiču ispod epitelitih stanica, vežu za specifične receptore, te ulaze u stanicu epitela zatvorene u fagosom. Potom izlaze iz fagosoma, brzo se razmnožavaju u citoplazmi i ubijaju stanicu domaćina. Neki sojevi *Shigella* proizvode jaki toksin zvan shiga-toksin, koji je kodiran genom na bakterijskom kromosomu i sastoji se od dva dijela. Strukturno je sličan toksinu kolere, a podjedinica A reagira s ribosomima domaćinovitih stanica, zaustavljajući sintezu proteina, zbog čega stanica umire. Dijelovi crijeva bez epitela su upaljeni, prekriveni gnojem i krvare, a rezultat su dizenterija i proljevi. Skupina enterohemoragičnih *E. coli*, serotipa O157:H7, u svom genomu sadrži dodatne sekvence DNA koje nisu prisutne u benignim sojevima, nego su zapravo ugrađeni bakteriofagi. Proizvodnja snažnog toksina, dakle, ovisi o lizogenoj konverziji bakteriofagom na kojem se nalazi gen za toksin. Veoma je sličan shiga-toksinu, također ometa sintezu proteina i uzrokuje odumiranje stanica crijevnog epitela. Posljedica je ozbiljno oboljenje s krvavim proljevom (Nester i sur. 2004).

3.1.2. Toksini koji oštećuju membrane

Kako im sam naziv kaže, djeluju tako da razaraju membrane stanica, uzrokujući njiovu lizu (prsnuće). Svrstavaju se među citotoksine, budući da oštećuju razne tipove stanica, a između ostalih i crvene krvne stanice, što se naziva hemoliza. Zato se većina ovih toksina naziva citolizinima, odnosno hemolizinima. Neki od njih se ubacuju u membrane, oblikujući pore koje omogućuju izlazak, tj. ulazak tvari i tekućina. Drugi su pak fosfolipaze, koje enzimatski uklanjaju polarnu glavu fosfolipida od kojih su građene membrane i tako ih destabiliziraju (Nester i sur. 2004).

Primjeri ovih toksina su leukocidini i hemolizini. Prvi su toksini koji ubijaju fagocitne leukocyte, te smanjuju imunološku otpornost domaćina, dok drugi formiraju pore u membranama eritrocita kroz koje izlaze molekule hemoglobina i ioni željeza. Oba su proteinski toksini koji se vežu na kolesterol u membranama stanica domaćina, umeću se u membranu i oblikuju kanale, tj. pore. Kroz njih izlaze sastojci citoplazme, a u stanicu ulazi voda, zbog čega ona bubri i prsne. Streptolizini O i S bakterije *Streptococcus pyogenes* predstavnici su hemolizina: liziraju eritrocite i leukocyte oblikujući pore u njihovim membranama. Streptolizin O odgovoran je za karakterističnu β -hemolizu koja odlikuje ovu bakteriju na krvnom agaru (očituje se kao čistina oko bakterijske kolonije) u anaerobnim uvjetima, jer ga kisik inaktivira. Streptolizin S je, za razliku od toga, netopiv, vezan je uz stijenku bakterije i stabilan u prisutnosti kisika, pa uzrokuje β -hemolizu na krvnom agaru u aerobnim uvjetima (Prescott i sur. 2005).

Još jedan primjer toksina koji oštećuju membrane je α -toksin bakterije *Clostridium perfringens*. Ova bakterija raste u mrtvom i nedovoljno oksigeniranom tkivu u anaerobnim uvjetima, te izlučuje toksin (Slika 5.), koji djeluje kao enzim fosfolipaza i napada lecitin (važan sastojak staničnih membrana domaćina). Toksin difundira iz zaraženog dijela u krvotok, gdje ubija leukocyte i eritrocite, te oštećuje kapilare tkiva, kao i stanice i druge strukture. Bakterija *C. perfringens* također proizvodi enzime kao što su kolagenaza, hijaluronidaza i drugi, koji razgrađuju makromolekule u mrtvom tkivu, zbog čega ono otiče. Fermentacijom aminokiselina i glikogena u mišiću, bakterija tijekom svojeg rasta proizvodi vodik i ugljikov dioksid. Ti se plinovi nakupljaju u tkivu, gdje rast pritiska pomaže širenju infekcije, te se razvija plinska gangrena (Nester i sur. 2004).



Slika 5. Alfa-toksin bakterije *Clostridium perfringens* (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Clostridium_perfringens_Alpha_Toxin.rsh.png)

3.1.3. Superantigeni

Neki bakterijski toksini mogu djelovati neposredno na T-limfocite i antigen-prezentirajuće stanice imunskog sustava, nespecifično ih aktivirajući. Ti se toksini direktno vežu na molekulu MHC II (na površini antigen-prezentirajućih stanica), ali na određene regije izvan uobičajenog utora za vezanje peptida. Istovremeno se toksini s druge strane vežu na specifični receptor na T-limfocitima. To uzrokuje masovnu proliferaciju T-stanica, zbog čega limfociti i monociti otpuštaju velike količine citokina (male proteinske molekule koje utječu na druge stanice i sudjeluju u signalizaciji). Javljaju se karakteristike sindroma toksičnog šoka: sniženje krvnog tlaka, vrućica i osip (Todar 2011). Usto je imunski odgovor suprimiran, jer mnoge T-stanice ulaze u apoptozu uslijed pretjerane stimulacije, a sumnja se i da sve to doprinosi nastanku autoimunih bolesti (Nester i sur. 2004).

Primjeri toksina koji djeluju kao superantigeni su toksini koje proizvode *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes*. Stafilokokni toksični šok se prije, kada još pravi uzročnik nije bio poznat, nazivao sindromom toksičnog šoka. Uzrokuju ga sojevi *S. aureus* koji sintetiziraju jedan ili više određenih vrsta egzotoksina, koji djeluju kao superantigeni. Toksin TSST-1 (engl. *toxic shock syndrome toxin-1*) odgovoran je za oko 75% slučajeva toksičnog šoka, a ostali su posljedica stafilokoknih enterotoksina. Kako djeluju kao superantigeni, ulaskom u krvotok uzrokuju masovno izlučivanje citokina. To dovodi do pada krvnog tlaka i otkazivanja bubrega, što su najopasnije posljedice stafilokoknog toksičnog šoka. Osim toga, *S. aureus* može rasti u nekim prehrambenim proizvodima i proizvoditi toksin koji je temperaturno stabilan (što znači da ga kuhanje

hrane neće uništiti). Taj toksin izaziva mučninu i povraćanje nakon konzumiranja hrane u kojoj je bakterija rasla i izlučila toksin (to je tzv. trovanje hranom) (Nester i sur. 2004).

3.1.4. Drugi toksični proteini

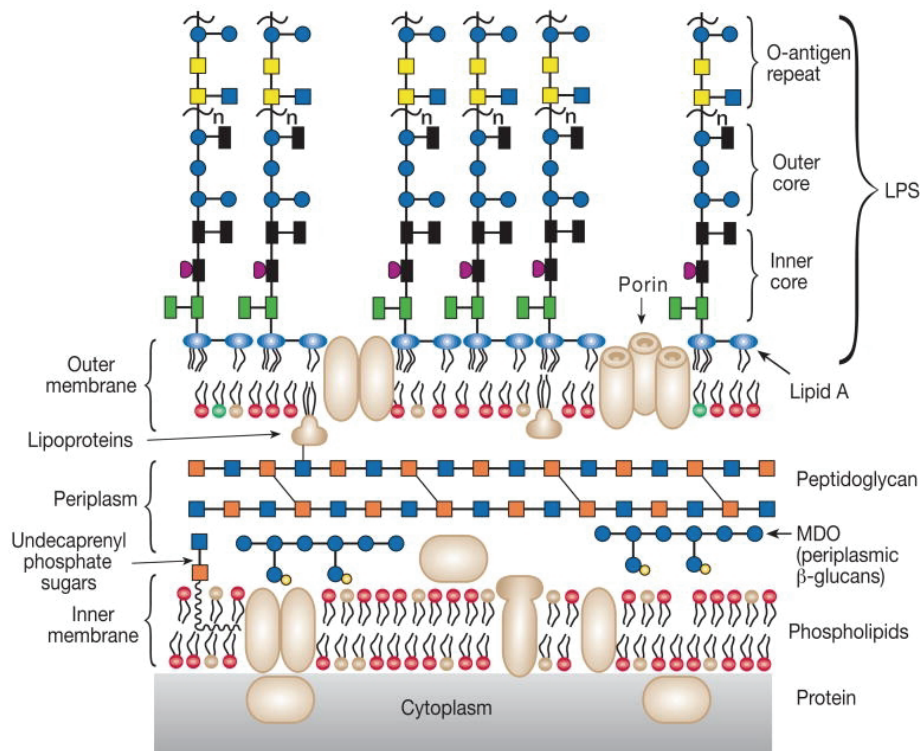
I drugi razni proteini, koji ne pripadaju niti jednoj spomenutoj skupini, mogu imati štetne učinke, kao što je to primjerice toksin eksfolijatin. Proizvode ga neki sojevi *Staphylococcus aureus*, a postoje dva tipa: jedan je kodiran na plazmidu, a drugi na bakterijskom kromosomu. Toksin putuje krvotokom, te na velikoj površini kože uzrokuje razdvajanje slojeva stanica epidermisa koji se nalaze ispod vanjskog sloja mrtvih keratinocita. Zbog toga koža izgleda opečeno, tijelo gubi puno tjelesnih tekućina i postoji opasnost od sekundarnih infekcija. Razni hidrolitički enzimi (proteaze, lipaze, kolagenaze) također mogu razgrađivati komponente tkiva, a usto mogu pomagati širenju bakterije (Nester i sur. 2004).

3.2. Endotoksin

Bakterije imaju, osim stanične membrane, još jednu barijeru koja im pruža zaštitu od okoliša u kojem žive, a to je čvrsta stanična stijenka. Ona održava integritet bakterijske stanice i određuje njen karakterističan oblik, te sprječava ulazak vode iz hipotonične okoline. Dva su različita strukturna tipa, prema kojemu se bakterije mogu podijeliti (prema različitom obojenju) na Gram-pozitivne i Gram-negativne. Stijenke Gram-pozitivnih bakterija su građene relativno jednostavno: od nekoliko slojeva peptidoglikana međusobno povezanih u čvrsti kostur. Za razliku od toga, stijenske Gram-negativnih bakterija imaju tek tanki sloj peptidoglikana uz staničnu membranu, te vanjsku membranu izvan njega. Ona je slična staničnoj membrani jer je također građena kao dvosloj, ali u njoj se samo jedan sloj sastoji od fosfolipida (onaj unutarnji), dok se vanjski sloj sastoji od lipopolisaharida (Hogg 2005).

Endotoksin je lipopolisaharid (kraće LPS), molekula koja čini vanjski dio vanjske membrane Gram-negativnih bakterija (Slika 6.). Za razliku od egzotoksina, koji se mogu izlučivati, endotoksin je sastavni dio vanjske membrane, nije termolabilan, te se ne može pretvoriti u djelotvoran toksoid za imunizaciju. Molekula LPS sastoji se od dva bitna

dijela: specifičnog polisaharidnog bočnog O-lanca (sadrži neobične šećere) i lipida A. Potonji je odgovoran za toksična svojstva LPS-a, međutim, ne izaziva imunski odgovor sve dok se nalazi u vanjskoj membrani i nije slobodan. Kada se on otpusti (najčešće zbog lize bakterijske stanice antibioticima, fagocitozom ili komponentama komplementa), LPS molekula može aktivirati urođenu i stečenu imunost raznim mehanizmima. (Nester i sur. 2004)



Slika 6. Stijenka Gram-negativnih bakterija: molekule lipopolisaharida (LPS) u vanjskoj membrani (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1945/>)

Monociti, makrofazi i druge stanice imaju specifične receptore kojima detektiraju oslobođeni LPS, koji ih potiče na proizvodnju proupalnih citokina. Osim toga, LPS djeluje i kao antigen neovisan o T-stanicama, što znači da, ako je prisutan u velikim koncentracijama, može aktivirati niz raznih B-stanica, bez obzira na specifičnost njihovog receptora. Takav snažan imunski odgovor može rezultirati sistemskom infekcijom, koju odlikuju upale u cijelom tijelu, ispuštanje tekućina kroz propusne krvne žile, aktivacija kaskade koagulacije, potom groznica, drastični pad krvnog tlaka, te koagulacijom unutar žila. Svi ovi simptomi povezani sa sistemskom bakterijskom infekcijom nazivaju se endotoksičnim šokom, budući da je uzrok endotoksin (Nester i sur. 2004).

Osim molekule LPS, i peptidoglikan i druge sastavnice bakterijske stijenke mogu izazvati simptome slične onima karakterističnima odgovoru na endotoksin. Obično se reakcija na ove komponente i endotoksin ne smatra štetnim učinkom imunskog odgovora,

nego toksičnim učinkom bakterije jer reakcije mogu biti neposredne i snažne (Nester i sur. 2004).

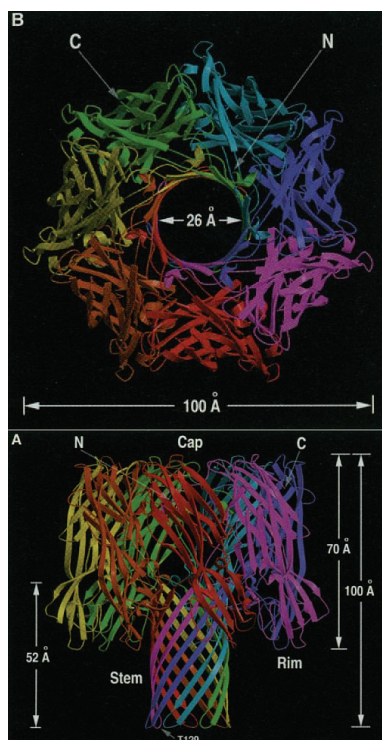
4. PRIMJENE BAKTERIJSKIH TOKSINA

Patogene bakterije i viši eukarioti već dugo vremena žive jedni uz druge, što je dovelo do dobrog razumijevanja načina na koji jedni i drugi funkcioniraju. Brzom evolucijom bakterije su stekle veoma sofisticirana oruđa kojima nastoje osigurati svoje preživljavanje, nehotice time specifično šteteći najosjetljivijim osnovnim funkcijama domaćina. No toksini nisu korisni samo bakterijama, već su postali osnovni alat znanstvenicima. Naime, razumijevanje načina na koje djeluju bakterijski toksini uvelike se povećalo, što je pak omogućilo da se molekularno odrede i, u nekim slučajevima, otkriju važni biološki putevi u stanici (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

U eksperimentima u staničnoj biologiji često je nužno da stanica bude živa, a da se ipak može pristupiti spojevima u njenoj citoplazmi. To se može postići upravo pomoću toksina koji oblikuju pore: oni se izlučuju kao proteini topivi u vodi, vežu se na receptore ciljanih stanica, te mnogi oligomeriziraju. Na taj način tvore amfipatsku, prstenastu strukturu koja se umeće u membranu i predstavlja poru, a ona ponekad može biti dovoljno velika da i proteini mogu prolaziti kroz nju. Primjerice, α -toksin *S. aureus* i aerolizin *Aeromonas* sp. prikladni su za stvaranje hidrofilnih pora određene veličine (promjera oko 1,5 nm), koje omogućuju izmjenu malih iona i nukleotida (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

S. aureus izlučuje monomere α -toksina (α -hemolizina; na Slici 7.), koji oligomerizacijom mogu tvoriti kanal pogodan za biotehnološke primjene. Sastavljanje genetički promijenjenog toksina može se potaknuti ili spriječiti vanjskim biokemijskim ili fizičkim podražajem. Takav se toksin može koristiti za kontrolirani unos iona i malih organskih spojeva (npr. šećera ili nukleotida) kroz membranu stanice. Ujedno se može upotrijebiti i kao stohastički senzor, budući da se reverzibilnim vezanjem analita na njega smanjuje transmembranska ionska struja inducirana prednaponom. Veličina smanjenja struje karakteristična je za određeni tip analita, dok učestalost, tj. frekvencija, smanjenja struje odražava koncentraciju analita u otopini, primjerice, organskih analita i metalnih iona ili dvaju proteina. Kroz ovu poru mogu prolaziti i relativno velike linearne

makromolekule, kao što su lanci DNA ili RNA. Stoga bi se preko blokada ionske struje mogla odrediti kemijska struktura pojedinih lanaca, stvarajući tako svojvrstan senzor koji bi mogao direktno s lanca «čitati» nukleotidnu sekvencu molekule DNA ili RNA (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/hemolysin/>).



Slika 7. Alfa-toksin (hemolizin) bakterije *Staphylococcus aureus*
(<http://colinwetherbee.com/weblog/archives/2006/12/alphahemolysin.html>)

Spomenuti toksin streptolizin O može formirati velike pore, koje omogućuju prolaz proteina. On pripada velikoj porodici toksina kojima je potreban kolesterol kao receptor u membrani, te može stvarati kanale promjera i do 35 nm. No unatoč pozitivnom potencijalu primjene ovih toksina, u obzir treba uzeti i činjenicu da oni izazivaju širok spektar staničnih događaja uslijed permeabilizacije. To su npr. aktivacija G-proteina, proizvodnja citokina, vakuolizacija endoplazmatskog retikuluma, itd., neke od kojih potiče tok iona, dok su ostali još nepoznatog uzroka (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Toksini su općenito aktivni i u veoma malim koncentracijama, prvenstveno jer mnogi od njih djeluju katalitički (enzimski), pa se stanični odgovori amplificiraju. Ali i zato što kao receptore koriste esencijalne molekule na površini ciljanih stanica. Zbog velikog afiniteta i specifičnosti za površinske receptore, toksini su izvrsne probe za praćenje molekula s kojima interagiraju. Primjer toga je toksin kolere: njegov B-dio se kao homopentamer veže za gangliozyd GM1 (glikosfingolipid prisutan u eukariotskim stanicama). Toksin se veže s mnogo većim afinitetom za GM1 ako se on nalazi u grupama,

kao u tzv. lipidnim splavima (engl. *lipid rafts*) u staničnoj membrani. Ove se strukture intenzivno istražuju zbog njihove uloge u raznim staničnim procesima, kao što su razvrstavanje membrana, signalizacija i homeostaza kolesterola. Toksin kolere, obilježen peroksidazom ili nekim fluoroformima, veoma je koristan u detekciji GM1 na samim stanicama pomoću elektronskih i fluorescencijskih mikroskopa. Osim njega, toksin lizenin specifično se veže za sfingomijelin, o čijoj je unutarstaničnoj raspodjeli malo poznato, pa bi dobrim obilježavanjem ovaj toksin mogao poslužiti za detekciju tog lipida (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Nekolicina bakterija proizvodi enzime koji djeluju na lipide i stoga su vrlo korisni u staničnoj biologiji. Primjer su topive fosfolipaze C, specifične za fosfatidilinozitol u bakterije *Bacillus cereus*. Ovi enzimi prepoznaju i cijepaju fosfatidilinozitol i njegove glukozilne derivate, pa se mogu koristiti za odcjepljivanje proteina usidrenih pomoću glikozilfosfatidilinozitola (GPI) sa površine stanice. Još su zanimljivi i enzimi sfingomijelinaze, također prisutni u *B. cereus*. Cijepaju sfingomijelin, stvarajući ceramid – sekundarni glasnik uključen u stanični rast, diferencijaciju, apoptozu i membranski transport (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Većina bakterijskih toksina posjeduje enzimatsku aktivnost prema specifičnoj ciljnoj molekuli u citoplazmi stanice domaćina. Zbog toga se ti toksini moraju unijeti endocitozom i transportirati u određeni stanični organel prije nego se presele u citosol. Ovi su toksini poznati kao prethodno spomenuti A-B toksini. Sastoje se od dva dijela: B (engl. *binding*) se veže na receptor i sudjeluje u unošenju u stanicu, dok A dio (engl. *active*) djeluje kao enzim. Staničnim biolozima su veoma zanimljivi putevi koje ove molekule koriste, pogotovo jer su njihova istraživanja omogućila detaljna saznanja o nekim koracima staničnog transporta, pa čak i otkriće novih unutarstaničnih puteva. Dakle, uz rasvjetljavanje samog početnog koraka unosa u stanicu, toksini su veoma doprinijeli proučavanju membranskog transporta (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Primjerice, istraživanjem shiga-toksina dokazano je da se molekule prenose s površine stanice do endoplazmatskog retikuluma (ER). Shiga-toksin se veže na globotriaozilceramid (Gb3) na površini stanice, unosi se u stanicu endocitozom i preko Golgijevog aparata se usmjerava u ER. Bakterijski toksini su stoga korisni alati za analizu raznih transportnih puteva u stanici, kao i za proučavanje još nedovoljno poznatih načina komunikacije između endocitičkih i biosintetskih puteva (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Neurotoksini, kao što su tetanospazmin i botulin, mogu se koristiti za proučavanje transporta u neuronima sisavaca. Oba toksina vežu se u neuromuskularnoj vezi (spoj aksona motoričkog neurona i mišićnog vlakna), te prolaze različite načine transporta u motoričkim neuronima. Botulin ostaje u sinapsi, tako da omogućava proučavanje mjesno-specifične endocitoze. Ali, budući da može ući u organizam kroz probavni sustav, može se koristiti i za proučavanje transporta u onim epitelnim stanicama debelog crijeva koje ga mogu vezati. Za razliku od botulina, toksin tetanusa se prenosi do tijela neurona i odande do inhibitornih interneurona, pa može poslužiti kao obilježivač za proučavanje transporta u neuronima (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Domene toksina odgovorne za vezanje i/ili translokaciju mogu se koristiti kao sredstva za dostavu peptida i proteina u stanicu. Primjerice, bakterija *Bordetella pertussis* sintetizira toksin čija katalitička domena ima adenilil-ciklaznu aktivnost i prenosi se direktno u stanicu, neovisno o endocitičkim putevima. Neaktivni oblik ovog toksina može se fuzionirati sa željenim peptidom ili proteinom, tako da se pomoću izazvanog biološkog odgovora može promatrati učinkovitost prijenosa u citoplazmu. Ovaj je pristup uspješno primijenjen u predočavanju peptida citosolnim putevima prezentacije antigena pomoću molekula MHC I. U ovim putevima proteasom prerađuje peptide koji dopiru u citoplazmu, nakon čega se oni prenose u ER. Tamo se vežu na novosintetizirane molekule MHC I kompleksa da se mogu prenijeti na površinu antigen-prezentirajuće stanice. Ne samo što su toksin *B. pertussis* i, sličan mu, shiga-toksin korisni za proučavanje predočavanja antigena, nego su ujedno i pogodni za razvoj cjepiva, jer *in vivo* izazivaju odgovor citotoksičnih T-limfocita (podskupina T-stanica koje mogu inducirati smrt zaraženih i tumorskih stanica). Također je uspješna dostava proteina i peptida u citoplazmu stanica pomoću toksina antraksa, toksina difterije, te B-podjedinica toksina C2 *C. botulinum*, toksina LT *E. coli*. Njihova je prednost prvenstveno to što su relativno malo izbirljivi prema ciljanim stanicama, jer su molekule koje služe kao njihovi receptori prisutne manje-više svugdje (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Enzimatska aktivnost A-B toksina može se koristiti i za promjenu specifičnih puteva signalizacije u stanici. Na primjer, pomoću toksina pertusisa otkriveni su inhibitorni heterotrimerni G-proteini, te se ovaj toksin intenzivno koristi za određivanje početnih koraka signalnih kaskada u biljnim i životinjskim stanicama. Toksin pertusisa prenosi ADP-ribosilira jednu od podjedinica nekoliko vrsta G-proteina. U slučaju inhibitornih G-proteina to rezultira utišavanjem inhibicije signalne kaskade, što aktivira neke nizvodne

izvršitelje: adenilil-ciklazu, fosfodiesterazu i ionske kanale. Za razliku od toga, toksin kolere i enterotoksin *E. coli* ADP-riboziliraju aktivacijske G-proteine. Time sprječavaju njihovu GTP-aznu aktivnost (vezanje i hidroliziranje GTP-a), zbog čega je adenilil-ciklaza konstantno aktivna, pa razina cAMP-a u stanici raste. I toksin LF (engl. *lethal factor*) bakterije *Bacillus anthracis* može utjecati na signalizaciju. Naime, kao cink-endopeptidaza, specifično cijepa nekoliko proteinskih kinaza porodice MAPKK. To su proteinske kinaze koje fosforiliraju kinaze MAPK, a koje reagiranjem na izvanstanične podražaje (mitogeni, osmotski stres, toplinski šok i proupalni citokini) reguliraju razne stanične aktivnosti (ekspresiju gena, mitozu, diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu). Cijepanje MAPKK izaziva pretjeranu stimulaciju upalnih odgovora makrofaga (fagocitnih leukocita), pa se može koristiti za pojačanje ekspresije citokina i tzv. «oksidacijski prasak» (povećana potrošnja kisika prilikom ubijanja mikroorganizma) u tim stanicama (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Osim za proučavanje unutarstaničnog transporta, neurotoksin tetanusa (Slika 8.) i botulin (Slika 9.) bili su ključni u razumijevanju fuzija (stapanja) membrana. Katalitičke domene oba ova toksina posjeduju enzimsku aktivnost cink-endopeptidaze, koja je specifična za članove proteinske porodice SNARE u sinapsi. Ta važna porodica proteina ima ulogu u stapanju sinaptičkih vezikula (koje sadrže neurotransmitere) s presinaptičkom membranom (općenito, u fuziji lipidnih dvoslojeva). Ali proteini SNARE sudjeluju i u svim koracima vezikularnog transporta tako da osiguravaju dosljednost u smjeru transporta. Iako je djelovanje tetanospazmina i botulina ograničeno na neurone, oni se mogu dopremiti i u neki drugi tip stanice, npr. permeabilizacijom stanice jednim od toksina koji oblikuju pore. Ili se pak aktivne domene tih neurotoksina mogu direktno ubaciti u stanicu fizičkim metodama, kao što je mikroinjektiranje. Takvim se postupkom mogu inaktivirati točno specifični SNARE-proteini u bilo kojem tipu stanice. Ciljanom ekspresijom aktivne podjedinice neurotoksina može se ukloniti određeni SNARE-protein u odabranim tkivima ili čak čitavom organizmu (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).



Slika 8. Toksin tetanusa bakterije *Clostridium tetani*
(<http://www.sciencephoto.com/media/7259/enlarge>)



Slika 9. Toksin botulin bakterije *Clostridium botulinum*
(<http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=426>)

Usto, vrste roda *Clostridium* proizvode i nekoliko citotoksina koji djeluju na citoskelet. Dinamičke promjene citoskeleta temelj su brojnih staničnih procesa, kao što su migracija stanica, polarizacija i citokineza. Većinu informacija o njima znanstvenici su dobili proučavanjem učinaka bakterijskih toksina čije su ciljne molekule aktin i regulatorne komponente aktinskog citoskeleta. Većina ovih toksina su enzimi koji ADP-ribozilacijom modificiraju monomerni G-aktin. Time sprječavaju njegovu polimerizaciju, što rezultira odvajanjem aktinskih mikrofilamenata (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

I drugi bakterijski toksini djeluju na citoskelet, ali oni modificiraju jedan tip malih proteina koji vežu GTP i koji su najvažniji regulatori dinamike aktinskih mikrofilamenata. Toksini negativno reguliraju te proteine, što općenito rezultira depolimerizacijom niti F-aktina te raspadanjem aktinskog citoskeleta. Za razliku od toga, neki toksini *E. coli* i vrsta roda *Bordetella* djeluju upravo suprotno: aktiviraju te iste proteine koji vežu GTP tako da specifično deaminiraju jedan od glutamina, čime se potiče još jače formiranje aktinskih niti (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Enterotoksin bakterije *Bacterioides fragilis* jedan je od tek nedavno identificiranih toksina. On ne treba ući u citoplazmu stanice kako bi pokrenuo reorganizaciju njenog aktinskog citoskeleta. Naime, ovaj toksin djeluje kao metaloproteaza te cijepa E-kadherin (transmembranski protein bitan u adheziji stanica) koji se nalazi na bazolateralnoj strani polariziranih stanica epitela. To rezultira poremećajem međustaničnih spojeva, uz gubitak

polarnosti stanice i promjenu u propusnosti stanične membrane (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Prisutnost selektivnih receptora (od kojih većina još uvijek nije poznata) na površini stanica uvjetuje specifičnost svih ovih toksina za razne tipove stanica. No ta se specifičnost može zaobići na nekoliko načina. Jedan od njih je da se katalitički dio toksina unese neposredno u citoplazmu pomoću permeabilizacije stanice s toksinom streptolizinom O. Ili se pak toksin može fuzionirati s B-dijelom jednog od toksina čiji su receptori česti ne mnogim stanicama (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Toksin *B. pertussis* veoma je koristan u proučavanju međusobnih interakcija proteina upravo zbog sposobnosti da se dva komplementarna dijela tog toksina reasociraju i tvore funkcionalni enzim s adenilil-ciklaznom aktivnošću. Za taj je proces potreban kalmodulin ili se pak može postići genskom fuzijom: svaki od dijelova tog toksina fuzionira se s po jednim od dva proteina za koje se pretpostavlja da interagiraju. Ako ti proteini doista interagiraju jedan s drugim, tada će doći do sastavljanja enzimski aktivnog toksina. Takav aktivni toksin će proizvoditi cAMP, koji će onda npr. potaknuti transkripcijsku aktivaciju kataboličkih operona (primjerice, najpoznatijeg Lac-operona). Zbog toga je moguće dobiti karakterističan fenotip bakterijskih kolonija za selekciju. Ovakav sustav s dva hibrida pruža eksperimentalni alat za praćenje interakcija proteina koje se zbivaju u citosolu stanice (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

Većina bakterijskih toksina, koji djeluju unutar stanice domaćina, ili uništavaju ili modificiraju proteine. Međutim, CDT-toksini (engl. *cytolethal distending toxins*) djeluju kao DN-aze I: cijepaju DNA tijekom replikacije. Time se u stanici aktiviraju mehanizmi koji provjeravaju kontrolne točke staničnog ciklusa i on se potom zaustavlja. Stoga CDT-toksini mogu poslužiti u istraživanjima kontrolnih točaka mitoze i membranskog transporta. Također raste i broj onih toksina koji induciraju apoptozu stanica (Schiavo i Gisou van der Goot 2001), što je u današnje vrijeme veoma aktivno područje istraživanja.

Iako je u zadnjih desetak godina postignut značajan napredak u poboljšanju postupka kemoterapije za liječenje tumora, razne nuspojave lijekova koji se koriste, kao i pojave otpornosti na njih, još uvijek predstavljaju nemalu prepreku takvom liječenju. To iziskuje pronalazak novih i učinkovitijih načina liječenja, a u njima bi se mogli koristiti upravo bakterijski toksini kao što su adenilil-ciklazni toksin *B. pertussis*, α -toksin *S. aureus* i toksin *E. coli* sličan shiga-toksinu. Naime, zbog svoje sposobnosti da induciraju apoptozu

u stanicama u kojima je taj proces onemogućen (jedno od obilježja tumorskih stanica), ti bi toksini mogli upotpuniti ili poboljšati terapijske učinke antitumorskih lijekova (Johansson 2008).

Mnogi ljudi ne smatraju da se toksin antraksa, osim u negativne, može iskoristiti i u pozitivne svrhe. Međutim, uskoro bi se njime mogli uspješno liječiti tumori. Letalni toksin antraksa sastoji se od dva dijela: protektivnog antigena (PA) i letalnog faktora (LF; na Slici 10.). Prvi se veže za površinu stanice, gdje ga aktivira furin-proteaza. Slijedi formiranje heptamera PA, te se LF preko njega prenosi u citosol, gdje djeluje kao metaloproteaza na gotovo sve kinaze MAPKK. A konstitutivno aktivne MAPKK (uslijed mutacije) odlika su upravo tumorskih stanica, konkretno melanoma (rak pigmentiranih stanica kože). No unatoč potencijalnoj upotrebi u liječenju tumora, nativni je letalni toksin još uvijek toksičan za normalne stanice. Stoga su znanstvenici bili suočeni s izazovom da razviju malo promijenjen toksin. To je učinjeno tako da se PA aktivira pomoću matriks-metaloproteaze, umjesto furin-proteazom. Zbog toga što tumorske stanice jako ekspimiraju tu metaloproteazu, ova modifikacija pojačava selektivnost toksina prema stanicama raka (i to nekoliko tipova tumorskih stanica), dok prema normalnim stanicama ne pokazuje toksičnost. Dakle, ovako modificirani toksin antraksa bi se ubrzo mogao koristiti kao novi lijek protiv raka (Liu i sur. 2005, <http://www.wellsphere.com/>).



Slika 10. LF dio toksina antraksa bakterije *Bacillus anthracis* (<http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=21>)

Egzotoksini su zbog svog proteinskog sastava pogodni za proizvodnju cjepiva, upravo zato jer kao proteini tretiranjem određenim agensima gube na svojoj toksičnosti, no ne i na imunogeničnosti. Stoga se toksini dobiveni iz bakterijskih suspenzija mogu

detoksificirati, odnosno tretiranjem raznim tvarima (poput formalina, joda, pepsina, askorbinske kiseline, ketona i sl.) dobivaju se toksoidi, koji zadržavaju antigeničnost originalnih toksina i njihovu sposobnost imunizacije. Takvi se pripravci mogu koristiti za umjetnu imunizaciju (Todar 2011). Vjerojatno najpoznatije cjepivo je DTP, tj. difterija-tetanus-pertusis, a sastoji se od toksoida difterije, tetanusa te pertusisa. Ono se daje u osnovnoškolskoj dobi, s ponavljanjem svakih 10 godina, kako bi se održala odgovarajuća razina zaštite (Nester i sur. 2004).

Jedna od svakako korisnih, i ne manje važnih, primjena bakterijskih toksina je u ulozi insekticida. Na taj se način omogućava bolja kontrola populacija komaraca i muha i drugih kukaca koji mogu postati vektori za prijenos bolesti kao što su malarija, žuta groznica, denga groznica i druge. Bakterije kao što su *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus* i *Clostridium bifermentas* uspješno se koriste u borbi protiv ličinačkih stadija spomenutih kukaca. Njihovi toksini vežu se za stanice epitela crijeva te uzrokuju niz citopatoloških događaja: pojavu velikih vakuola u stanicama, bubrenje mitohondrija, stvaranje pora u membranama, itd. Toksičnost najviše proizlazi iz stvaranja proteinskih inkluzija tijekom sporulacije bakterija (Charles i Nielsen-LeRoux 2000).

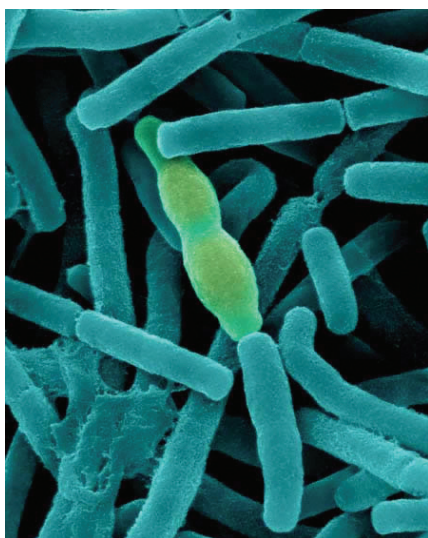
Danas se već uzgaja transgenični kukuruz, tj. kukuruz koji je genetički tako modificiran da na jednom od svojih kromosoma sadrži gen za toksin iz bakterije *B. thuringiensis*. Ova je bakterija česta u tlu, nalazi se i na listovima biljaka te u skladištenom žitu. Njen toksin djeluje selektivno: samo na određene skupine kukaca, između ostalih na kukuruznog moljca. Ličinke ovog kukca ugibaju nedugo nakon unošenja zelenog tkiva biljke kukuruza u kojem se nalazi toksin. U alkaličnoj sredini crijeva toksin se aktivira i formira pore u probavnom traktu. To omogućuje drugim bakterijama u crijevu da prodru u tkivo i namnože se te uzrokuju sepsu, pa ličinka ugiba. Zbog spomenute specifičnosti za određene kukce, ovaj je kukuruz siguran za ljude (nisu poznati škodljivi učinci na ljudsko zdravlje) i druge organizme koji mu nisu meta, za razliku od mnogih insekticida koji se koriste u zaštiti usjeva (<http://www.ext.colostate.edu/pubs/crops/00707.html>).

U svjetlu svih ovih pozitivnih primjena bakterijskih toksina u staničnoj i molekularnoj biologiji, medicini i drugim područjima, neizbježno je ipak istaknuti i jednu od negativnih strana primjene toksina: bioterorizam. U novije se vrijeme on definira kao «namjerna ili prijetuća uporaba virusa, bakterija, gljivica ili toksina iz organizama za izazivanje smrti ili bolesti ljudi, životinja i biljaka». Biološka bi se oružja mogla pokazati destruktivnijima od kemijskih, a pod određenim okolnostima i mnogo razornija od

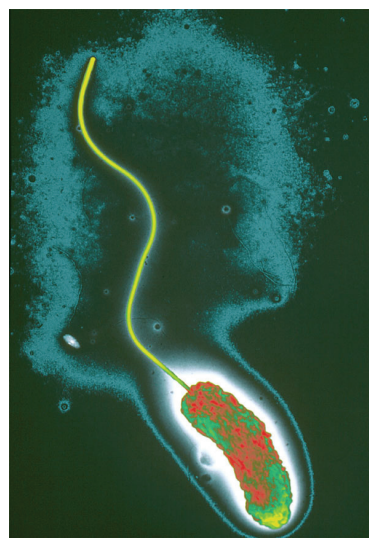
nuklearne eksplozije. U biološke se agense ubrajaju neke već spomenute bakterije *B. anthracis* (Slika 11.), *V. cholerae* (Slika 12.), zatim *Yersinia pestis* te toksin difterije, botulin, endotoksin kolere, stafilokokni enterotoksin B, itd. Ukoliko se pravilno (strateški) rašire u slučaju bioterorističkog napada, ovi bi agensi mogli postati doista težak izazov za javno zdravstvo, u smislu ograničavanja broja žrtava i kontrole štete. (Prescott i sur. 2005).

Endospore bakterije *B. anthracis* posebno su pogodne kao biološki agensi za napad, upravo zbog svoje iznimne izdržljivosti. Te spore mogu izdržati visoke temperature, kao i tretman kemijskim dezinfekcijskim sredstvima i zračenje. U okolišu su stabilne, te mogu opstati i desecima godina, nakon čega još uvijek mogu proklijati u vegetativne stanice. Za uništavanje ovih spora potrebna je puno veća koncentracija (čak nekoliko tisuća puta) dezinfekcijskih sredstava nego za uništavanje vegetativnih stanica, ili pak puno dulje izlaganje visokoj temperaturi (Hogg 2005).

Unatoč učinkovitoj zaštiti koju pružaju cjepiva protiv toksina pojedinih mikroorganizama, visoke cijene i problemi cijepljenja velikih populacija, dakako uz široki spektar potencijalnih agenasa, otežavaju korištenje cjepiva za zaštitu populacije od bioterorizma (Prescott i sur. 2005).



Slika 11. Bakterija *Bacillus anthracis*
(<http://so83ctp.edu.glogster.com/bacillus-anthraxis/>)



Slika 12. Bakterija *Vibrio cholerae*
(<http://www.humenhealth.com/vibrio-cholerae-2/vibrio-cholerae.asp>)

5. ZAKLJUČAK

U neprekidnoj potrazi za novim ekološkim nišama koje bi mogle nastaniti, bakterije su znanstvenike opskrbile neprocjenjivim oruđem za specifičnu inhibiciju ili preinaku ključnih procesa u stanici. Nema sumnje da ćemo otkriti još, dosad nepoznatih, toksina, baš kao što otkrivamo i nove bakterijske vrste, kako korisne, tako i patogene. Štoviše, sekvenciranje genoma patogenih bakterija, koje je u tijeku, omogućit će sve bržu identifikaciju čimbenika virulentnosti, dok će se njihov način djelovanja moći otkriti zahvaljujući sve važnijoj i aktualnijoj staničnoj mikrobiologiji (Schiavo i Gisou van der Goot 2001).

6. LITERATURA

Charles J-F i Nielsen-LeRoux C (2000) Mosquitocidal Bacterial Toxins: Diversity, Mode of Action and Resistance Phenomena. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95(1):201-206

Dale JW i Park SF (2004) Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons Ltd, Chichester

Hogg S (2005) Essential Microbiology, John Wiley & Sons Ltd, Chichester

Johansson D (2008) Bacterial Toxins for Cancer Treatment. Umeå University Medical Dissertations, New Series No 1178, Umeå University, Sweden

Liu S, Redeye V, Kuremsky JG, Kuhn M, Molinolo A, Bugge TH i Leppla SH (2005) Intermolecular complementation achieves high-specificity tumor targeting by anthrax toxin. *Nat Biotechnol* 23(6):725-730

Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Pearsall NN i Nester MT (2004) Microbiology: A Human Perspective, McGraw-Hill, New York

Prescott LM, Harley JP i Klein DA (2005) Microbiology, McGraw-Hill, New York

Schiavo G i Gisou van der Goot F (2001) The Bacterial Toxin Toolkit. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:530-537

Schmitt CK, Meysick KC i O'Brien AD (1999) Bacterial Toxins: Friends or Foes?. *Emerging Infectious Diseases Journal* 5(2):224-234

Todar K (2011) Todar's Online Textbook of Bacteriology. Bacterial Protein Toxins (<http://www.textbookofbacteriology.net/proteintoxins.html>)

<http://colinwetherbee.com/weblog/archives/2006/12/alphahemolysin.html>

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Clostridium_perfringens_Alpha_Toxin.rsh.png

<http://oldschoolscience.com/2010/10/25/happy-birthday-antonie-van-leeuwenhoek/>

<http://so83ctp.edu.glogster.com/bacillus-anthraxis/>

<http://toxipedia.org/display/toxipedia/Botulinum+Toxin>

<http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=21>

<http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=426>

http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2005_9/Page2.htm

<http://www.ext.colostate.edu/pubs/crops/00707.html>

<http://www.humenhealth.com/vibrio-cholerae-2/vibrio-cholerae.asp>

<http://www.ks.uiuc.edu/Research/hemolysin/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1945/>

<http://www.sciencephoto.com/media/7259/enlarge>

<http://www.textbookofbacteriology.net/proteintoxins.html>

<http://www.wellsphere.com/general-medicine-article/human-cancer-therapy-using-engineered-anthrax-lethal-toxin/1151021>

7. SAŽETAK

Usporedo s evolucijom bakterija tekao je i razvoj njihovih toksina, koji im omogućuju određene prednosti u nekim ekološkim nišama ili za vrijeme parazitskog odnosa s domaćinom, za kojeg su toksini štetni prilikom infekcije. U ovom su radu predstavljene osnovne skupine bakterijskih toksina i njihovi predstavnici. Istaknut je i doprinos koji su neki od toksina dali u istraživanju staničnih puteva u eukariotskim stanicama te u medicinskim primjenama, a zasigurno će u budućnosti, s otkrivanjem novih bakterijskih vrsta, bakterijski toksini nastaviti značajno utjecati na modernu znanost.

8. SUMMARY

Along with the evolution of bacteria, their toxins have evolved to provide them with certain advantages in some of the ecological niches or during a parasitic relationship with the host, to which toxins are harmful in the course of infection. In this paper, basic types of bacterial toxins are presented, with representative examples. Also highlighted here is the contribution of some of them to the research of eukaryotic cellular pathways, as well as to medicinal applications, and together with the discovery of new bacterial species, bacterial toxins will most certainly continue to significantly affect modern science.